

**SPEZIFISCHER TRANSPORT VON
ANORGANISCHEM PHOSPHAT,
3-PHOSPHOGLYCERAT UND TRIOSEPHOSPHATEN
ÜBER DIE INNERE MEMBRAN DER
CHLOROPLASTEN-HÜLLE**

Rainer Fliege

1977

Aus dem
INSTITUT FÜR PHYSIOLOGISCHE CHEMIE, PHYSIKALISCHE BIOCHEMIE
UND ZELLBIOLOGIE DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Vorstände: Prof. Dr. Dr. h.c. Th. Bücher, Prof. Dr. E. M.
Klingenberg, Prof. Dr. F. Miller, Prof. Dr. H.
G. Zachau

SPEZIFISCHER TRANSPORT VON ANORGANISCHEM PHOSPHAT,
3-PHOSPHOGLYCERAT UND TRIOSEPHOSPHATEN ÜBER DIE
INNERE MEMBRAN DER CHLOROPLASTEN-HÜLLE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Rainer Fliege

aus
Halle/Saale

Jahr
1977

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. W. Heldt

Mitberichterstatter: Prof. Dr. E. M. Klingenberg

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 5.07.1977



Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater,
Herrn Prof. Dr. H. W. Heldt, für die Überlassung
des Themas und seine immerwährende Bereitschaft,
mir auf experimentellem und theoretischem Gebiet
zur Seite zu stehen.

Fräulein M. Freisl danke ich für die Anfertigung
der in meiner Arbeit enthaltenen Zeichnungen.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

2. METHODISCHER TEIL

2.1 Isolierung der Spinatchloroplasten, Inkubationsbedingungen, verwendete Radioisotope

2.2 Technik der Silikonölfiltrationszentrifugation

2.3 Bestimmung der Räume

2.4 Messung des Metabolit-Transportes

A. Bestimmung der direkten Substrataufnahme in den Sorbit-impermeablen Raum

B. Messung der Substrataufnahme und -freisetzung in Rücktauschexperimenten

2.5 Trennung des anorganischen vom organischen Phosphat

2.6 Enzymatische Bestimmungen

2.7 Messung der Phosphataufnahme in Abhängigkeit von der Temperatur

2.8 Dünnschicht-Radiographie

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Kinetik des Phosphat-Transportes

3.2 Kinetische Konstanten des Phosphat- und 3-Phosphoglycerat-Transportes

3.3 Kompetitive Hemmung des Phosphat-Transportes

3.4 Spezifität des Phosphat-Carriers

3.5 Gegentausch

3.6 Pyrophosphat-Transport

3.7 Temperaturabhängigkeit des Phosphat-Transportes

3.8 Die Abhängigkeit des Phosphat- und 3-Phosphoglycerat-Transportes vom Medium-pH

3.9 Abhängigkeit der 3-Phosphoglycerat- und Phosphat-
aufnahme von der Beleuchtung und der Zugabe di-
valenter Kationen

3.10 Abhängigkeit des Phosphat- und 3-Phosphoglycerat-
Transportes vom pH-Gradienten über die innere
Chloroplastenmembran

4. SCHLUSSFOLGERUNG

5. ZUSAMMENFASSUNG

6. ABKÜRZUNGEN

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

Bei der pflanzlichen Photosynthese werden mit Hilfe der Lichtenergie aus den anorganischen Substanzen CO_2 und H_2O Kohlenhydrate synthetisiert. Die Photosynthese stellt einen für das Leben elementaren Prozeß dar, weil Tier und Mensch diese organischen Substanzen nicht bilden können, aber zum Aufbau ihrer körpereigenen Verbindungen benötigen. Diese lichtabhängige Kohlendioxid-Assimilation ist außerdem der mit einem jährlichen Umsatz von 10^{10} - 10^{11} Tonnen fixierten Kohlendioxids mengenmäßig größte Vorgang auf der Erde.

Sie ist bei den Protocyten noch ein Geschehen innerhalb der einfachsten zellulären Organisation, während sie bei den Eucyten, also bei allen grünen Pflanzen in spezifischen Zellorganellen, den Chloroplasten stattfindet.

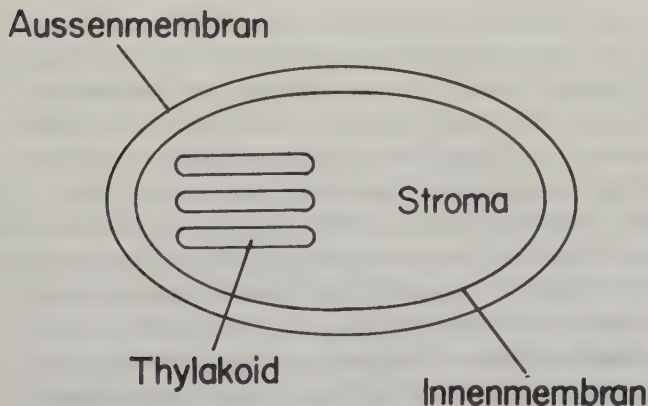


Abbildung 1 - Schematischer Aufbau eines Chloroplasten

Die Chloroplasten besitzen eine Hülle, die aus einer äußeren und inneren Membran besteht. Im Inneren der Zellorganelle befindet sich ein weiteres Membransystem, die Thylakoide. Sie sind Stapel von flachen Säckchen, die lichtmikroskopisch sichtbar sind und als Grana bezeichnet werden.

Aus der beschriebenen Chloroplastenstruktur ergeben sich drei verschiedene Räume: Der Intermembranraum zwischen innerer und äußerer Hüllmembran, der Stromaraum zwischen innerer Hüllmembran und den Thylakoidmembranen, und der von den Thylakoidmembranen eingeschlossene Thylakoidraum.

An diesen Thylakoidmembranen findet die eine, Lichtenergie-abhängige Teilreaktion der Photosynthese statt, die Photolyse des Wassers und die Bildung von NADPH und ATP. Die zweite, Lichtenergie-unabhängige Teilreaktion mit Fixierung des Kohlendioxids und Bildung von Kohlenhydraten läuft im Stroma ab, wo die dafür notwendigen Enzyme des Calvinzyklus lokalisiert sind.

Die Aufgabe des Chloroplasten ist es, die Zelle mit den bei der Photosynthese entstehenden Produkten zu versorgen. Dies bedingt einen Stoffaustausch zwischen beiden Kompartimenten (Heber 1974). Er vollzieht sich über beide Membranen, von denen die äußere für niedermolekulare Substanzen, wie Sorbit, Saccharose, Phosphat, Nucleotide und Dicarbonsäure (Heldt und Sauer 1971) permeabel ist, während sich die innere Membran für diese Substrate als impermeabel erweist. Sie bildet die eigentliche funktionelle Grenze zwischen Stroma und Cytosol (Heldt und Sauer 1971). In den letzten Jahren konnten ihr für den Substrat-Transport vier spezifische Transportmechanismen zugeordnet werden. Nach der Art der eingeschleusten Verbindungen wurden sie als Adeninucleotid- (Heldt 1969), Dicarboxylat- (Lehner und Heldt 1977), Glucose- (Schäfer et al. 1977) und Phos-

phattranslokator (Heldt und Rapley 1970) bezeichnet.

Es ist nun Aufgabe dieser Arbeit, Eigenschaften des Phosphattranslokators näher zu untersuchen und zu beschreiben.

2. METHODISCHER TEIL

2.1 Isolierung der Spinatchloroplasten, Inkubationsbedingungen, verwendete Radioisotope

Um ein qualitativ gleichbleibendes Arbeitsmaterial in den Händen zu haben, wurde Spinat aus eigener Züchtung verwendet. Die Isolierung der Chloroplasten erfolgte nach der von Cockburn et al. (1968) entwickelten und später von Heldt und Sauer (1971) modifizierten Methode. Die Prüfung der Präparation unter dem Phasenkontrast-Mikroskop (Leech 1966) ergab, daß 70-90 % der Organellen intakt waren. Zum Experimentieren wurden sie in einem Medium suspendiert, das aus Sorbit 0,33 M, N-2 Hydroxyäthylpiperazin-N-2-äthansulfonsäure (HEPES) 50mM pH 7,6, MnCl_2 1mM, MgCl_2 1 mM und EDTA 2mM bestand und mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,6 eingestellt worden war. Die Menge der Chloroplasten wurde üblicherweise auf den Chlorophyllgehalt der Suspension bezogen. Seine Bestimmung erfolgte photometrisch nach der von Whatley und Arnon (1963) beschriebenen Methode. Die Inkubation der Chloroplasten in einem Wasserbad und einer auf 4°C eingestellten Kühllinsel sicherten das experimentelle Arbeiten bei der gewünschten Temperatur. Sollten die Chloroplasten belichtet werden, so wurde hierfür eine Wolfram-Halogenlampe mit einem RG 630 Filter (Fa. Schott, Mainz) und einem Calflex C - Hitzefilter (Fa. Balzers, Lichtenstein) verwendet. Die Lichtintensität betrug 80 000 erg/cm² sec, die Zeitdauer der Vorbelichtung 3-5 Minuten.

Folgende radioaktive Substanzen wurden verwendet:

- (¹⁴C)-3 Phosphoglycerat (0,3 - 1 Ci/Mol, Boehringer, Mannheim)
- (³²P)-H₃PO₄ (0,3 - 1 Ci/Mol, Amersham, Braunschweig)
- (¹⁴C)-Sorbit (1·10⁻³ Ci/Mol, New England Nuclear, Boston, USA)
- ³H₂O (1·10⁻⁴ Ci/Mol, Amersham, Braunschweig)

$(^{32}\text{P})\text{-H}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (0,3 - 1 Ci/Mol, Amersham, Braunschweig)
5,5 Dimethyloxazolidine (2,4 -dione-2- ^{14}C) = ^{14}C -DMO
(0,3 - 1 Ci/Mol, New England Nuclear, Boston, USA)
 $(^{14}\text{C})\text{-Methylamin}$ (6 Ci/Mol, New England Nuclear, Boston, USA)

2.2 Technik der Silikonölfiltrationszentrifugation

Meßtechnik

Die von Klingenberg und Pfaff (1967) sowie Heldt und Sauer (1971) entwickelte Technik der Silikonölfiltrationszentrifugation gestattete es, die Aufnahme von Substraten in den Sorbit-impermeablen Raum der Chloroplasten zu bestimmen und Transportvorgänge sekundenschnell zu beenden. Als Arbeitsgefäß dienten kleine Polypropylen-Röhrchen. Sie wurden schichtweise von der Spitze zur Öffnung hin mit 20 μl 10%iger HClO_4 , 70 μl Silikonöl (Wacker Chemie, München, AR 100 : 150 = 3 : 1) und 300 μl Chloroplastensuspension gefüllt. Die Transportvorgänge wurden durch Substratzugabe zur Suspension in Gang gesetzt und durch sekundenschnelles Abzentrifugieren der Chloroplasten in die denaturierende HClO_4 beendet. Ihre Trennung vom Medium vollzog sich innerhalb von 1 - 2 Sekunden nach Beginn der Zentrifugation. Die verwendete Mikrozentrifuge (Beckmann) erreichte nach 1 Sekunde mit 12 000 U/Min. ihre volle Geschwindigkeit.

Aufarbeitung der Proben

Die Berechnung der Räume und der Substrataufnahme in den Sorbit-impermeablen Raum beruht auf der Messung des Anteils des radioaktiven Überstandes, der sich nach der Zentrifugation im Sediment befindet. Es wurden deshalb 50 μl des Überstandes (Schicht über dem Öl) entnommen, in Szintillatorflüssigkeit (60 g Butyl - PBD und 6 l Toluol und 4 l Methyl-

glykol) pipettiert und in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler (Fa. Philips) mit Quench-Korrektur gezählt. Für die Ermittlung der Sedimentsaktivität wurde die Spitze des Polypropylen-Röhrchens knapp über der HClO_4 -Schicht abgeschnitten und in ein mit 300 μl H_2O gefülltes Mikroreaktionsgefäß (1,5 ml, Fa. Netheler & Hinz, Hamburg) gegeben. Nach maschinellem Schütteln und Zentrifugieren des Röhrchens konnten 200 μl daraus zur Radioaktivitätsmessung entnommen werden.

2.3 Bestimmung der Räume

Man unterscheidet drei Räume:

a) Wasserraum

Er umfaßt das gesamte Chloroplastenvolumen und den Anteil des mitgerissenen Mediums. Seine Größe wird mit ^3HHO bestimmt.

b) Sorbitraum

Er besteht aus dem bei der Zentrifugation mitgerissenen Volumen und dem Volumen des Intermembranraumes. Seine Messung erfolgt mit (^{14}C)-Sorbit.

c) Sorbit-impermeabler Raum

Er wird von der inneren Hüllmembran umgeben und umfaßt den Stroma- und Thylakoidraum. Seine Größe errechnet sich durch Subtraktion des Sorbitraumes vom Wasserraum.

Experimentelle Durchführung

1000 μl Chloroplastensuspension wurden in ein Mikroreaktionsgefäß pipettiert, das 10 μl (^{14}C)-Sorbit (1,5 μCi) und 10 μl ^3HHO (7,5 μCi) enthielt. Nach einer Inkubationsdauer von 3 Minuten bei 4°C wurden 3 Polypropylen-Röhrchen mit 300 μl Suspension gefüllt. Durch anschließendes Zentrifugieren wurde der Meßvorgang beendet.

Raumberechnung

Wie oben erwähnt, basieren alle Berechnungen auf der Messung derjenigen Überstandsaktivität, die nach dem Zentrifugieren im Sediment erscheint. Wird der errechnete Wert auf die eingesetzte Menge Chlorophyll bezogen, so erhält man den gesuchten Raum in $\mu\text{l}/\text{mg}$ Chlorophyll.

$$\text{Raum} = \frac{\text{dpm in Sediment} \cdot \text{Volumen Überstand}}{\text{dpm in Überstand} \cdot \text{mg Chlorophyll/Probe}}$$

Obwohl in den einzelnen Experimenten die Absolutwerte der Räume kleinen Schwankungen unterworfen waren, ergab sich für das Verhältnis des Sorbit-impermeablen Raumes zum Wasser-raum ein nahezu konstantes Verhältnis von 50 - 60 %.

2.4 Messung des Metabolit-Transportes

Der Metabolit-Transport in Chloroplasten wurde entweder direkt über die Aufnahme radioaktiver Verbindungen in den Sorbit-impermeablen Raum bestimmt, oder nach Beladen der Chloroplasten mit markierten Substraten, indirekt über die im Gegentauch erfolgende Freisetzung radioaktiver Substanzen.

A. Bestimmung der direkten Substrataufnahme in den Sorbit-impermeablen Raum

Versuchsdurchführung

Die im Inkubationsmedium suspendierten Chloroplasten wurden im Wasserbad auf einer Temperatur von 4°C gehalten. Die Versuche selbst fanden ebenfalls bei dieser Temperatur in einer Kühlinsel und bei Dämmerlicht statt. Zur Chlorophyllbestimmung wurde eine bestimmte Menge der Chloroplastensuspension abpipettiert und der Chlorophyllgehalt photometrisch bestimmt. Für die Aufnahmebestimmung phosphathaltiger Verbindungen waren vorher $300 \mu\text{l}$ der Suspension in

die oben beschriebenen Polypropylen-Röhrchen abgefüllt worden. Die phosphathaltigen Verbindungen wurden durch einen kleinen 10 μ l fassenden Metallöffel mischend den Chloroplasten zugesetzt.

Bei der Km- und Vmax.-Bestimmung von (32 P)-anorganischem Phosphat oder (14 C)-3 Phosphoglycerat wurden die Aufnahme-raten bei steigenden Konzentrationen gleichzeitig gemessen. Die Meßzeit wurde mit 10 Sekunden möglichst kurz gehalten und war durch Abzentrifugieren der Chloroplasten in die HClO_4 -Schicht beendet.

Berechnung der Substrataufnahme in den Sorbit-impermeablen Raum

Die spezifische Aktivität wurde durch die im Überstand eingesetzte Menge an Substrat und Aktivität vorgegeben. Es wurde bei allen Experimenten darauf geachtet, daß die Radioaktivität im Überstand so hoch bemessen war, daß sie nach dem Zentrifugieren im Sediment weniger als 1 % des Ausgangswertes ausmachte. Die Division der Sediments-aktivität durch die spezifische Aktivität und die eingesetzte Chlorophyllmenge ergab die Gesamtsubstratmenge im Sediment. Von ihr wurde, um die Menge an Substrat im Sorbit-impermeablen Raum zu erhalten, die von den Chloroplasten mitgerissene Substratmenge subtrahiert. Die Division der von den Chloroplasten aufgenommenen Menge an Substrat durch den Wert des impermeablen Raumes lieferte die in diesem Kompartiment vorliegende Konzentration.

$$C_S = \frac{\frac{D_S}{A \cdot \text{Chl}} - C_M \cdot R_S}{R_{H_2O} - S}$$

C_S = Substratkonzentration im Sorbit-impermeablen 3H_2O -Raum (mM)

C_M = Substratkonzentration im Medium (mM)

D_S = dpm in der Sedimentfraktion

A = spezifische Radioaktivität (dpm/nMol)

Chl = Chlorophyllgehalt (mg in Probeansatz)

R_g = Sorbit-Raum (μ l)

R_{H_2O-S} = Sorbit-impermeabler 3H_2O -Raum (μ l)

B. Messung der Substrataufnahme und -freisetzung in Rücktauschexperimenten

Versuchsdurchführung

Nach der Präparation wurden 500 μ l bis 1000 μ l der konzentrierten Chloroplasten-Suspension bei $0^\circ C$ und völliger Dunkelheit 15 - 20 Minuten lang mit 5 mM (^{32}P)-anorganischem Phosphat (1,8 Ci/Mol) beladen. Auf diese Weise konnte das gesamte anorganische Phosphat in den Chloroplasten gegen das außen vorgegebenemarkierte Phosphat ausgetauscht werden. Nach der Inkubation wurde die Suspension mit Medium auf 30 ml aufgefüllt und 300 μ l davon zur Bestimmung der spezifischen Aktivität abpipettiert. Dann wurden die Chloroplasten zweimal gewaschen und erneut mit Medium auf die gewünschte Suspensionsmenge gebracht.

Für die Berechnung der im Gegentausch freigesetzten Menge an (^{32}P)-anorganischem Phosphat war es notwendig, bei jedem Experiment einen Kontrollwert (Leakage) zu ermitteln. Dieser gab an, wieviel anorganisches Phosphat schon im Überstand war, bevor den Chloroplasten überhaupt Phosphatverbindungen zum Gegentausch angeboten worden waren. Die

Versuche liefen bei 4°C in einer Kühllinsel bei Dämmerlicht (Ausnahme: Lichtexperimente) ab.

Die Aufnahmeberechnung der zum Gegentauch angebotenen Verbindungen gestaltete sich wie bei A. beschrieben.

Eine weitere Modifizierung des Versuchstyps ergab sich aus der Tatsache, daß viele Phosphatverbindungen in radioaktiver Form nicht erhältlich waren. Deshalb konnte ihre Aufnahme in den Sorbit-impermeablen Raum nicht direkt gemessen werden. Bei der Erstellung der kinetischen Konstanten dieser Verbindungen wurde darum die Tatsache ausgenutzt, daß auch beim Angebot unmarkierter Phosphat-Verbindungen konzentrationsabhängig im Gegentauch (^{32}P)-anorganisches Phosphat aus den Chloroplasten freigesetzt wurde. Die Versuche konnten dabei experimentell in gleicher Weise wie bei A. beschrieben durchgeführt werden. Die Berechnung erfolgte nach den unten beschriebenen Verfahren.

Für die Beantwortung der Frage, welche Substrate der CO_2 -Fixierung über den Phosphatcarrier aus dem Sorbit-impermeablen Raum transportiert wurden, bediente man sich der gleichen eben erwähnten Versuchstechnik. Die Chloroplasten wurden bei diesen Experimenten nach ihrer Isolation bei $16 - 17^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad mit (^{32}P)-anorganischem Phosphat ($0,1 \text{ mM}$ Inkubationsendkonzentration) beladen. Während der Inkubation wurden sie, um eine ausreichende CO_2 -Fixierung zu gewährleisten, mit NaHCO_3 (3 mM Endkonzentration) versetzt und dann mit 2 Projektoren (je $80\,000 \text{ erg/cm}^2 \text{ sec.}$) belichtet. Der Gegentauch erfolgte bei einem Teil der Experimente im Licht, bei einem anderen im Dunkeln. Für die Auftrennung der hinaustransportierten Produkte der CO_2 -Fixierung in eine anorganische und organische Fraktion wurde die Methode von Nielsen und Lehninger (1955) angewandt.

Berechnung

Die n Mole/mg Chlorophyll an freigesetztem (^{32}P)-anorganischem Phosphat lassen sich sowohl aus der Zunahme der Radioaktivität im Überstand, wie auch aus deren Abnahme im Sediment bestimmen.

$$S = \frac{D_{\ddot{U}}}{A \cdot \text{Chl}} + \frac{D_{\ddot{U}} - D_{\ddot{U}K} \cdot R_X}{A \cdot V_{\ddot{U}}} - \frac{D_{\ddot{U}K}}{A \cdot \text{Chl}}$$

S = freigesetzte Substratmenge (n Mole/mg Chl)

$D_{\ddot{U}}$ = dpm in Überstandsfractionen

$D_{\ddot{U}K}$ = dpm in Überstandsfractionen bei Kontrolle ohne Phosphatzusatz

$V_{\ddot{U}}$ = Volumen Überstand (,ul)

A = spezifische Radioaktivität (dpm/n Mol)

Chl = Chlorophyllgehalt (mg in Probenansatz)

R_S = Sorbit-Raum

2.5 Modifizierte Methode von Nielsen und Lehninger (1955)

für die Trennung des anorganischen vom organischen Phosphat

Diese Methode macht sich die Tatsache zunutze, daß freies Orthophosphat und Molybdat einen in organischen Lösungsmitteln (z.B. Isobutanol - Benzol) löslichen Komplex bildet, während organisch gebundene Phosphate nicht reagieren. Man kann so aus einem wässrigen (^{32}P)-Phosphat enthaltenden Medium nach Zugabe von Molybdatreagenz und anschließender Extraktion mit Isobutanol-Benzol das anorganische Phosphat vollständig entfernen. Die noch verbleibende (^{32}P)-Phosphataktivität in der wässrigen Phase entspricht dann dem organisch gebundenen Phosphat. Das Reagenz, bestehend

aus Ammoniummolybdat 0,011 M und Schwefelsäure 0,7 M, war mit Extraktionsmittel, das Extraktionsmittel (Isobutanol-Benzol, 50 : 50 Volumenteile) mit Reagenz gesättigt. Bei der Aufarbeitung des Experimentes wurde aus dem Überstand der Polypropylen-Röhrchen 100 μ l zu 500 μ l 0,6 M HClO_4 und weitere 100 μ l Überstand zu 100 μ l 1 M KOH pipettiert. Durch die Perchlorsäure wurde jegliche Enzymaktivität des Überstandes gestoppt. In der KOH-Probe erfolgte während einer halbstündigen Inkubationszeit bei Zimmertemperatur (21°C) eine alkalische Hydrolyse der bei der CO_2 -Fixierung entstandenen Triosephosphate. Anschließend wurde auch diese Probe mit 400 μ l 1 M HClO_4 versetzt. Nachdem 500 μ l der Probe mit 1500 μ l Reagenz kräftig 3 Minuten lang gemischt worden waren, wurden 300 μ l des Gemisches für die Bestimmung der Gesamtmenge Phosphat gezählt. Der Rest wurde mit 10 ml Extraktionsmittel 20 Sekunden lang geschüttelt. Dann wartete man ab, bis sich die Phasen vollständig voneinander getrennt hatten. Die obere Phase (Extraktionsmittel) wurde abgesaugt und verworfen, zur verbleibenden wässrigen Phase 5 μ l 100 mM anorganisches Phosphat zugesetzt, kurz durchgemischt, dann 10 ml Extraktionsmittel zugegeben. Die nach erneutem Ausschütteln und Absaugen erhaltene wässrige Phase diente zur Bestimmung des organischen Phosphates. Durch Subtraktion des organischen Phosphates vom Gesamtphosphat ergab sich die Menge an anorganischem Phosphat. Die Menge der hydrolysierten Triosephosphate errechnete sich aus der Differenz der wässrigen Phase der ursprünglichen HClO_4 - und KOH-Proben. Die exakte Trennung des anorganischen vom organisch gebundenen Phosphat wurde in einer Reihe von Probeexperimenten untersucht und durch ein zweimaliges "Ausschütteln" vollständig erreicht.

2.6 Enzymatische Bestimmung nach Bergmeyer 1970

Nach Hydrolyse von Dihydroxyacetonphosphat-dimethylketal und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat-diäthylacetal gemäß der Vorschrift nach Boeninger, Mannheim, wurden DAP und D-GAP enzymatisch bestimmt:

- a. Enzymatische Bestimmung der Konzentration von DAP mit der Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (GDH)

Testansatz: 750 μ l Triäthanolamin-Puffer 100 mM pH 7,6

10 μ l NADH 10 mM

10 μ l auszutestende DAP-Lösung (ca. 5 mM)

Der Start erfolgte durch Zugabe von 10 μ l GDH (1,2 U); gemessen wurde bei der Wellenlänge $\lambda = 334$ nm.

- b. Bestimmung der Konzentration von D-GAP:

Testansatz: 750 μ l Triäthanolamin-Puffer 100 mM pH 7,6

10 μ l NADH 10 mM

10 μ l GDH (1,2 U)

10 μ l auszutestendes D-GAP

Gestartet wurde mit 10 μ l Triosephosphat-Isomerase (TIM); (10 U); gemessen wurde bei der Wellenlänge $\lambda = 334$ nm.

2.7 Messung der Phosphataufnahme in Abhängigkeit von der Temperatur

Die Aufnahme von anorganischem Phosphat in den Sorbit-impermeablen Baum wurde bei Temperaturen zwischen 0°C und 19°C gemessen. Die Bestimmung der Aufnahmeraten bei den verschiedenen Temperaturen erfolgte gleichzeitig. Durch Verwendung einer suboptimalen Phosphat-Konzentration (0,05 mM) und einer kurzen Meßzeit (5 Sekunden) versuchte man ein Arbeiten im linearen Bereich zu erreichen.

Berechnung der Aktivierungsenergie:

$$\log K = \text{Konstante} - \frac{A}{2,3 \cdot R} \cdot \frac{1}{T}$$

T = °Kelvin

R = 0,002 $\frac{\text{kcal}}{\text{Mol}}$

Die Aktivierungsenergie errechnete sich aus der Steigung einer Geraden in einem Koordinatensystem, in dem die Aufnahmegeschwindigkeit logarithmisch in Richtung der Y-Achse und die Meßtemperatur als $10^3/T$ in Richtung der X-Achse aufgetragen wurden.

2.8 Dünnschicht-Radiographie

Um den Reinheitsgrad einiger radioaktiver Zuckerphosphate zu prüfen, wurden diese auf Zellulose-Dünnschichtplatten (20 x 20 cm, DC Fertigplatten, Merck, Darmstadt) aufgetragen. Die Laufzeit betrug 1 - 3 Stunden; als Fließmittel diente das basische System: Methanol - Ammoniak (25 %ig) - Wasser = 7 : 1 : 2. Die Radioaktivität wurde durch einen TLC-Scanner (Berthold-Friesecke, Karlsruhe) bestimmt.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Kinetik des Phosphattransportes

Abbildung 2 zeigt die Zeitabhängigkeit der Phosphataufnahme in den Sorbit-impermeablen Raum.

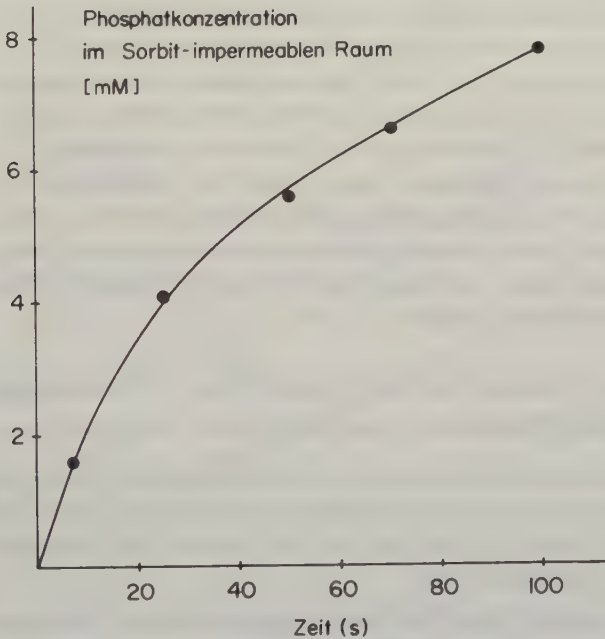


Abbildung 2

Kinetik der Phosphataufnahme in den Sorbit-impermeablen Raum von Spinat-Chloroplasten. (Phosphat-Konzentration im Medium 1 mM) Temp. 4°C

Direkte Messungen der Phosphataufnahme in den Sorbit-impermeablen Raum mit Hilfe der Silikonölfiltrations-zentrifugation ließen einen sehr schnellen Hineintransport in den Chloroplasten erkennen. Dabei stieg die Innenkonzentration des Substrates nach 30 Sekunden um das Vierfache der ursprünglich im Medium eingesetzten Konzentration an. Wegen der Schnelligkeit dieses Hineintransportes mußten die Versuche, um die in der Zeiteinheit aufgenommene Phosphatmenge noch im linearen Bereich zu erfassen, mit einer kurzen Meßzeit (10 Sekunden) und bei einer tiefen Temperatur (4°C) durchgeführt werden. Weiterhin wurden in der Regel alle Versuche im Dunkeln ausgeführt. Dadurch konnte, weil keine CO_2 -Fixierung und lichtbedingte Alkalisierung des Stromas (Heldt et al. 1973) erfolgte, unter standardisierten metabolischen Bedingungen und mit einem nur durch das Medium-pH beeinflussten Stroma-pH gearbeitet werden.

3.2 Kinetische Konstanten des Phosphat- und 3-Phosphoglycerat-Transportes

Die folgenden Experimente zeigen, daß die Menge des in den Sorbit-impermeablen Raum aufgenommenen Substrates nicht nur von der Zeit, sondern auch von der im Medium eingesetzten Konzentration abhängig ist.

Werden den Chloroplasten im Medium anorganisches Phosphat und 3-Phosphoglycerat in steigender Konzentration angeboten, und nach einer kurzen Meßzeit ihre Aufnahmezeiten bestimmt, so erhält man einen Maximalwert der Phosphat- und 3-Phosphoglyceratkonzentration im Sorbit-impermeablen Raum, der auch bei weiterer Erhöhung der Substrat-Menge im Medium nicht mehr überschritten werden kann. Der Phosphat- und 3-Phosphoglycerat-Transport zeigt damit das für einen Carrier typische Sättigungsverhalten.

Bei einer doppelt reziproken Auftragung der Transportrate gegen die im Medium eingesetzte Substratkonzentration ergab sich eine lineare Funktion, mit der die Michaelis-Konstante (jene Substratkonzentration, bei der halbmaximale Transportgeschwindigkeit erreicht wird) und die $V_{\max}$ (maximale Transportgeschwindigkeit bei Substratsättigung) berechnet werden konnten. Abbildung 3 zeigt eine solche doppelt reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk.

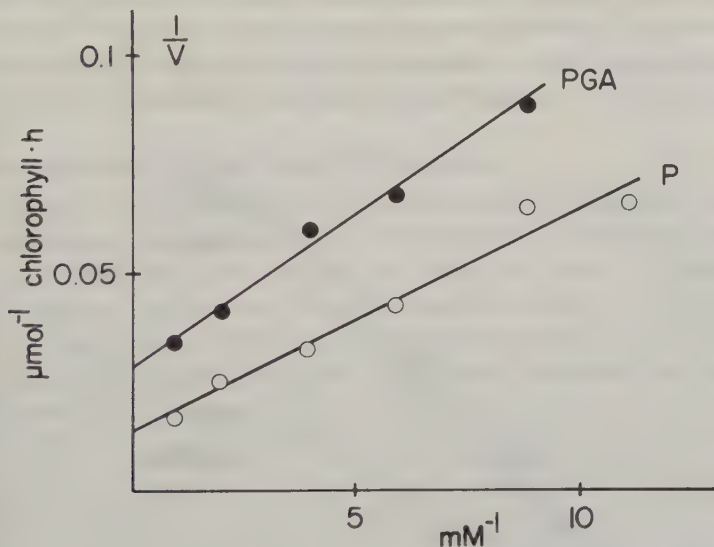


Abbildung 3

Konzentrationsabhängigkeit der Phosphat- und 3-Phosphoglycerat-Aufnahme (4°C , 10 Sekunden).

Man erkennt, daß die Michaelis-Konstante für 3-Phosphoglycerat kleiner als für anorganisches Phosphat ist, und damit eine größere Affinität des Carriers für 3-Phosphoglycerat besteht. Dagegen ist die maximale Transportgeschwindigkeit für anorganisches Phosphat in diesem Experiment doppelt so hoch wie für 3-Phosphoglycerat.

3.3 Kompetitive Hemmung des Phosphattransportes

Mißt man konzentrationsabhängig die Aufnahme von anorganischem Phosphat einmal in Anwesenheit von 3-Phosphoglycerat und zum anderen in Abwesenheit dieser Verbindung, so erhält man nach der oben beschriebenen doppelt reziproken Auftragungsweise 2 Geraden, die die Ordinate in einem Punkt und die Abszisse an zwei Stellen schneiden.

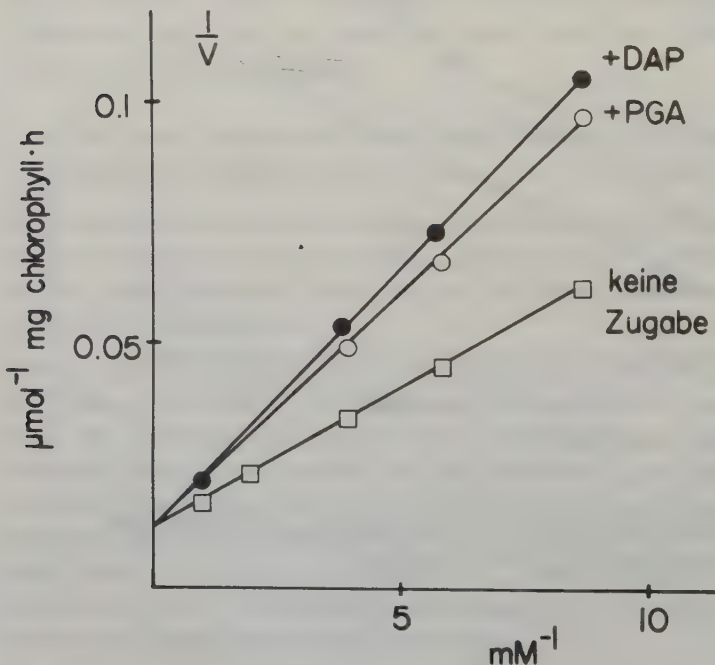


Abbildung 4

Kompetitive Hemmung des Phosphattransportes durch Dihydroxyacetonphosphat (0,1 mM) und 3-Phosphoglycerat (0,1 mM)
Temp. 4°C, Dunkelheit.

Dieses Bild ist charakteristisch für das einer kompetitiven Hemmung. Es zeigt auch, daß der Phosphattransport nicht nur durch 3-Phosphoglycerat, sondern in stärkerem Maße auch durch Dihydroxyacetonphosphat gehemmt wird. Schon in früheren, hier nicht aufgeführten Experimenten konnte man beobachten, daß diese Verbindungen den Phosphattransport hemmen, umgekehrt ihr Hineintransport in die Chloroplasten wiederum durch Phosphat kompetitiv gehemmt wird (Werdan und Heldt 1972). Daraus schloß man, daß anorganisches Phosphat, 3-Phosphoglycerat und Dihydroxyacetonphosphat von einem gemeinsamen Carrier transportiert werden. Bei einem Vergleich der Michaelis-Konstanten von Phosphat und anderen phosphorylierten Substraten mit ihren Hemmkonstanten ergab sich eine Übereinstimmung ihrer Werte.

3.4 Spezifität des Phosphat-Carriers

Diese Übereinstimmung von Hemmkonstante und Michaelis-Konstante war besonders für Substanzen interessant, die nicht in radioaktiver Form vorlagen und deren Aufnahmen deshalb nicht direkt gemessen werden konnte. In diesem Fall war es nun möglich, die Hemmkonstante als Maß für die Affinität des Carriers zu diesen Substraten heranzuziehen.

Tabelle 1

Kompetitive Hemmung des Transportes von anorganischem Phosphat (K_m 0,2 mM) 4°C, Dunkelheit

Hemmsubstanz (mM)	Ki (mM)
Dihydroxyacetonphosphat	0,13
3-Phosphoglycerat	0,15
2-Phosphoglycerat	6,5
2,3-Phosphoglycerat	9,1
1-Glycerophosphat	1,3
2-Glycerophosphat	7,7
Phosphoenolpyruvat	4,7
Erythrose 4-Phosphat	2,3
Ribose 5-Phosphat	10
Fructose-1,6-diphosphat	8,5
Fructose 6-Phosphat	13
Glucose 6-Phosphat	40
6-Phosphogluconat	20
2,3-Diphosphoglycerat	9,1
Arsenat	0,35
Citrat	1,5
L-Malat	6,6
Malonat	30

Die Daten der Tabelle 1 informieren darüber, welche Konfiguration Verbindungen besitzen müssen, um vom Carrier akzeptiert zu werden. Die größte Affinität zum Carrier besitzen demnach anorganisches Phosphat, Arsenat und C-3 Kohlenstoffketten, die am endständigen C-Atom ein verestertes Phosphatmolekül gebunden halten, wie z.B. 3-Phosphoglycerat und Triosephosphate. Deshalb wird

in gewissem Grad auch 1-Glycerophosphat transportiert. Je länger die Kohlenstoffkette wird, um so geringer ist die Neigung des Carriers, diese Substrate zu binden. So werden C-4-Verbindungen wie Erythrose 4-Phosphat nur noch schwach, Pentosen und Hexosen überhaupt nicht mehr transportiert. Wie streng die Carrier-Spezifität ist, zeigt sich auch aus dem Ergebnis, daß C-3-Verbindungen vom Carrier nicht mehr akzeptiert werden, wenn die Phosphatgruppe wie beim 2-Phosphoglycerat, Phosphoenolpyruvat und 2-Glycerophosphat mit dem C-2-Atom verknüpft ist.

3.5 Gegentauch

Die weiteren Experimente zeigen, daß der Carrier Phosphat und phosphorylierte Substrate nicht nur in die Chloroplasten hineintransportiert, sondern im Gegentauch arbeitet.

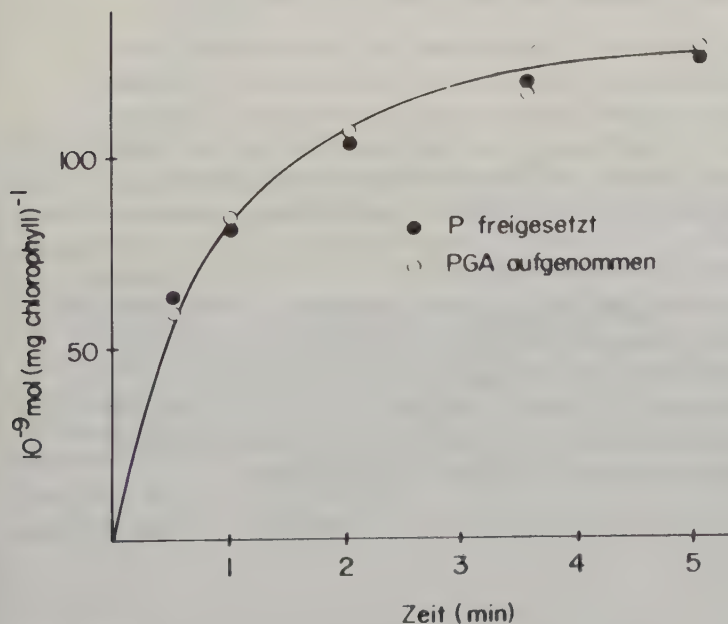


Abbildung 5

Gegentauch: Chloroplasten mit $(^{32}\text{P})\text{-KH}_2\text{PO}_4$ im Dunkeln vorbe-laden. Zum Gegentauch wurde $(^{14}\text{C})\text{-3-PGA}_4$ (0,27 mM Endkonzentration im Medium) angeboten. Temp. 0°C, Dunkelheit.

Werden die Chloroplasten bei 0°C und völliger Dunkelheit mit (^{32}P) -anorganischem Phosphat beladen, dann erfolgt bei Vorgabe von (^{14}C) -3-Phosphoglycerat ein streng gekoppelter Gegentausch, bei dem die Summe des hineintransportierten 3-Phosphoglycerates gleich der Menge an freigesetztem anorganischen Phosphat ist.

Abbildung 5 verdeutlicht, daß bei gleichzeitiger Messung der Aufnahme von (^{14}C) -3-Phosphoglycerat und der Freisetzung von (^{32}P) -anorganischem Phosphat beide Werte auch über einen weiten Zeitraum gleich groß sind. Ein Auseinanderweichen der Kurven, bedingt durch einen im Vergleich zur Substratfreisetzung verstärkten Hineintransport, wie es beim Dikarbonsäurecarrier während längerer Meßzeiten der Fall ist (Lehner und Heldt 1977), wurde in Experimenten, in denen die Inkubation der Chloroplasten mit (^{32}P) -anorganischem Phosphat erfolgte, nicht festgestellt.

Die strenge Kopplung zwischen Ein- und Austransport gestattete es nun, die Aufnahme nicht radioaktiver Phosphatverbindungen indirekt über die Freisetzung des (^{32}P) -anorganischen Phosphats aus den Chloroplasten zu bestimmen. Damit konnten für die nicht markierten Substanzen neben der Michaelis-Konstante auch die V_{max} ermittelt werden.

Hierfür wurden die Chloroplasten mit (^{32}P) -anorganischem Phosphat beladen und anschließend gewaschen. Dann erfolgte durch Vorgabe der unmarkierten Verbindungen im Medium konzentrationsabhängig die Freisetzung des radioaktiven Phosphates. Wie aus Abbildung 6 ersichtlich, war es auf diese Weise ohne weiteres möglich, die kinetischen Konstanten der nichtradioaktiven Substanzen zu bestimmen.

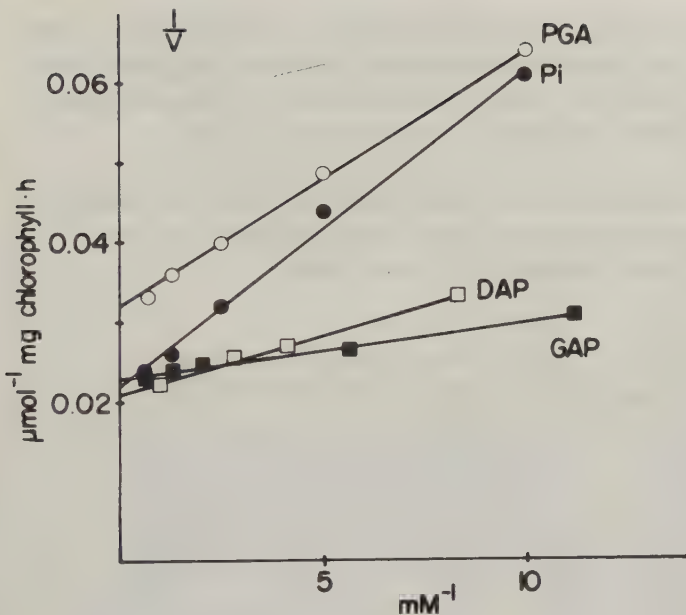


Abbildung 6

Bestimmung der kinetischen Konstanten von Phosphat, 3-Phosphoglycerat, Dihydroxyacetonphosphat und D-Glycerinaldehyd-phosphat durch Rücktausch. Temp. 4°C , 8 sec., Dunkelheit.

Die durch Rücktauschexperimente gewonnenen kinetischen Konstanten von anorganischem Phosphat und 3-Phosphoglycerat waren dabei identisch mit denen, die durch Messung der direkten Substrataufnahme in den Sorbit-impermeablen Raum ermittelt wurden. Die Michaelis-Konstante von anorganischem Phosphat lag mit $0,3 \text{ mM}$ wieder höher als die K_m von Dihydroxyacetonphosphat, 3-Phosphoglycerat und Glycerinaldehydphosphat.

Gleich waren die Maximalgeschwindigkeiten von anorganischem Phosphat und Dihydroxyacetonphosphat, während Glycerinaldehydphosphat und vor allem 3-Phosphoglycerat langsamer als die beiden vorher genannten transportiert wurden.

Tabelle 2 zeigt kinetische Konstanten von weiteren unmarkierten Phosphatverbindungen aus Experimenten, die wie oben beschrieben durchgeführt worden waren.

Tabelle 2

Bestimmung der kinetischen Konstanten von Phosphat und anderen phosphorylierten Substraten im Gegentausch. Einzelheiten s. Methodik und im Text. Temp. 40°C, 8 sec., Dunkelheit.

Substanzen	K _m (mM)	V _{max} /μMol/mg Chlorophyll h	n
anorg. Phosphat	0,30 (0,15-0,50)	57 (40-91)	16
Dihydroxyacetonphosphat	0,13 (0,06-0,22)	51 (36-74)	8
Glycerinaldehydphosphat	0,08 (0,025-0,17)	41 (37-44)	7
3-Phosphoglycerat	0,14 (0,09-0,19)	36 (29-45)	10
2-Phosphoglycerat	2,8 (1,8-3,7)	24 (20-26)	4
1-Glycerophosphat	1,06 (0,7-1,4)	59 (45-71)	8
Phosphoenolpyruvat	0,43 (0,35-0,52)	18 (17-19)	2
Erythrose 4-Phosphat	0,80 (0,70-0,91)	46 (42-50)	4
Ribose 5-Phosphat	6,11 (5,5-6,6)	6 (5,8-6,6)	2
Phenylphosphat	0,60 (0,48-0,79)	4 (3,6-5,0)	3
Pyrophosphat	bei kurzen Meßzeiten nicht bestimmbar		5
Citrat	bei kurzen Meßzeiten nicht bestimmbar		4

Die Ergebnisse bestätigen das, was schon zuvor über die Spezifität des Carriers gesagt worden war. Kohlenstoff-Verbindungen mit C-3-Atomen und einem endständigen Phosphatrest, wie z.B. 3-Phosphoglycerat werden vom Carrier besser akzeptiert und transportiert als z.B. 2-Phosphoglycerat, bei dem der Phosphatrest am C-2-Atom gebunden ist. Auch die Kettenlänge ist für die Affinität des Carriers zum Substrat mitentscheidend. Der um einen Kohlenstoff kürzere Zucker Erythrose 4-Phosphat besitzt eine kleinere K_m und eine höhere V_{max} als die Pentose Ribose 5-Phosphat. Bemerkenswerterweise unterscheiden sich aber die Maximalgeschwindigkeiten dieser Substanzen nur unwesentlich. Das bedeutet, daß die Spezifitätsunterschiede des Carriers für seine Verbindungen in erster Linie durch die verschiedene Bindungseigung bestimmt werden. Sind die Substrate einmal am Translokator gebunden, dann werden sie recht ähnlich transportiert.

Für Pyrophosphat konnten in dieser Experimentengruppe bei der verwendeten kurzen Meßzeit von 8 Sekunden keine kinetischen Konstanten bestimmt werden. Aus den vorherigen Versuchen wußte man aber durch den K_i -Wert, daß der Carrier dieses Substrat bindet.

3.6 Pyrophosphat-Transport

Um zu erfahren, ob Pyrophosphat nur gebunden, nicht aber transportiert wird, wurden Experimente durchgeführt, bei denen der direkte Transport von radioaktivem Pyrophosphat in den Sorbit-impermeablen Raum gemessen wurde.

Pyrophosphat selbst führt bei der CO_2 -Fixierung intakter Chloroplasten zu einer Verkürzung der Verzögerungsphase. Dieser Vorgang erscheint so interessant, daß die Wirkung des Pyrophosphats durch Studien des Transportes zu klären versucht wurde.

Da bei niedriger Temperatur und kurzer Meßzeit die Pyrophosphataufnahme in den Sorbit-impermeablen Raum nicht meßbar ist, wurde der folgende Versuch bei einer höheren Temperatur (22°C) und längerer Meßzeit durchgeführt. Die Messung des direkten Hineintransportes erfolgte mit (^{32}P)-Pyrophosphat unter Lichteinwirkung.

Tabelle 3

Aufnahme von (^{32}P)-Pyrophosphat (Mediumkonzentration: 2,2 mM) in den Sorbit-impermeablen Raum von Spinat-chloroplasten. Temp. 22°C.

Zusatz	Aufnahme von Pyrophosphat / $\mu\text{Mol mg Chlorophyll}^{-1}\text{h}^{-1}$ (22°C)
ohne	1,3
+ anorg. Phosphat (0,2 mM)	0,4

Tabelle 3 zeigt, daß die Pyrophosphataufnahme in den Sorbit-impermeablen Raum bei Zimmertemperatur und genügend langer Meßzeit bestimmt werden kann. Die Aufnahme rate liegt aber mit 1,3 $\mu\text{Mole/mg Chlorophyll} \cdot \text{h}$ sehr niedrig und weist, wie hier nicht gezeigte Versuche ergeben haben, keinen Licht-Dunkelunterschied auf.

Da die eingesetzte Pyrophosphatkonzentration (2,2 mM Endkonzentration) etwa der K_i des Pyrophosphattransportes entspricht (s. Tabelle 2: K_m 1,8 mM), sollte die ermittelte Aufnahme rate etwa der halben Maximalgeschwindigkeit entsprechen. Daraus ließe sich für Pyrophosphat bei 22°C eine maximale Transportrate von 2,6 $\mu\text{Mole/mg Chlorophyll} \cdot \text{h}$ ableiten. Dieser Wert ist um zwei Größenordnungen kleiner als die Maximalgeschwindigkeit des Phosphates bei dieser Temperatur.

In den vorherigen Experimenten war schon gezeigt worden, daß Pyrophosphat den Phosphattransport hemmt. Umgekehrt wird hier sichtbar, wie anorganisches Phosphat mit einer Endkonzentration von 0.2 mM die Aufnahme des in 10-fach höherer Endkonzentration eingesetzten Pyrophosphates um 70 % hemmt.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die gegenseitige Hemmung ein Hinweis dafür ist, daß anorganisches Phosphat und Pyrophosphat über den gleichen Carrier transportiert werden. Die Transportgeschwindigkeit von Pyrophosphat ist aber im Gegensatz zu anorganischem Phosphat sehr niedrig.

Versucht man nun zu erklären, warum bei Zugabe von Pyrophosphat die CO_2 -Fixierung schneller in Gang kommt, so bietet sich folgende Hypothese an: Wird den Chloroplasten außen Phosphat in hoher Konzentration angeboten, so wird dieses schnell in den Sorbit-impermeablen Raum transportiert und im Gegentauch β -Phosphoglycerat und Triosephosphate ausgeschleust, die beide wie Phosphat über den gleichen Carrier laufen. Durch den Hinaustransport der zuletzt genannten Substrate verarmt aber das Stroma an den Intermediaten der CO_2 -Fixierung, und es kommt dadurch zu ihrer Hemmung (Walker 1976). Bei einer geringen Zugabe von anorganischem Phosphat erfolgt dagegen der Austransport von Phosphoglycerat und Triosephosphaten langsamer. Die CO_2 -Fixierung beginnt dann zwar früher, sinkt aber in ihrer Aktivität durch den schnellen Verbrauch der geringen Phosphatmenge eher wieder ab. Die Anwesenheit von Pyrophosphat könnte aber eine höhere Konzentration von anorganischem Phosphat außerhalb der Chloroplasten zulassen, weil ein verstärkter Phosphat-Hineintransport durch Pyrophosphat gehemmt und damit ein schnellerer Beginn der CO_2 -Fixierung ermöglicht würde.

Ebenfalls verkürzend auf die Verzögerungsphase bei der CO_2 -Fixierung wirkt Citrat. Es besitzt eine in derselben Größenordnung wie Pyrophosphat vorliegende Michaelis-Konstante und wird vom Phosphat-Carrier darum in gleicher Weise akzeptiert. Seine Transportgeschwindigkeit ist wie die des Pyrophosphates auch bei kurzen Meßzeiten und tiefen Temperaturen nicht bestimmbar (s. Tabelle 2).

Damit liegt im Citrat wiederum ein Substrat vor, das durch seine Affinität zum Carrier bei gleichzeitiger Konkurrenz mit einer anderen Verbindung um diesen Translokator hemmend wirkt, ohne dabei von ihm in größerem Umfang transportiert zu werden.

3.7 Temperaturabhängigkeit des Phosphattransportes

Der Transport durch den Phosphat-Carrier ist stark temperaturabhängig. Im Experiment der Abbildung 7 wurde die Abhängigkeit der Aufnahmeraten von der Temperatur gemessen. Aus der Steigung der linearen Funktion ließ sich nach der Arrhenius-Gleichung die Aktivierungsenergie für den Phosphattransport errechnen.

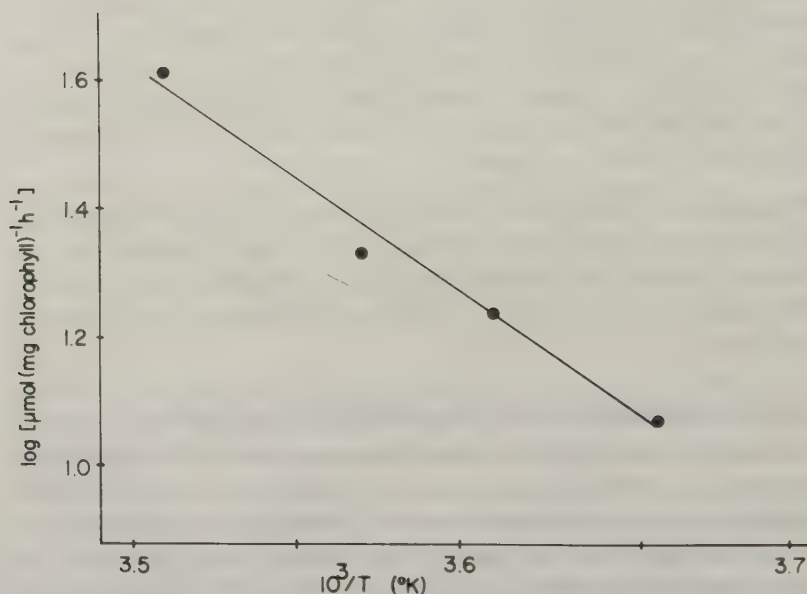


Abbildung 7

Temperaturabhängigkeit des Phosphattransportes (^{32}P)- KH_2PO_4
 Endkonzentration: 0,05 mM; T = - 273°C, Dunkelheit

Die Aktivierungsenergie war mit durchschnittlich 16 Kcal/Mol in einem Temperaturbereich von 0°C bis 12°C zweimal so groß wie die Aktivierungsenergie des Dicarboxylat-Carriers (Lehner und Heldt 1977). Man kann dann daraus extrapolieren, daß die Geschwindigkeit des Phosphattransportes bei 20°C etwa 5 mal höher ist als bei 4°C. Die Frage, ob sich bei einem Temperaturwechsel die V_{max} oder die Michaelis-Konstante des 3-Phosphoglycerates ändert, wurde durch Experimente beantwortet, in denen konzentrationsabhängig gleich-

zeitig bei 0°C und 10°C die PGA-Aufnahme gemessen wurde. Eine Zusammenstellung und eine Durchschnittswertberechnung der Michaelis-Konstanten und Maximalgeschwindigkeiten des 3-Phosphoglycerat-Transportes bei verschiedenen Temperaturen zeigt Tabelle 4.

Tabelle 4

Temperaturabhängigkeit der kinetischen Konstanten des 3-Phosphoglycerat-Transportes (5 sec, Dunkelheit)

	Temp. (°C)	Km (mM)	Vmax ($\mu\text{mol mg Chloro.}^{-1}\text{h}^{-1}$)
3-PGA	0°	0,20	44
	10°	0,18	85

Die Michaelis-Konstante für 3-Phosphoglycerat blieb über einen Temperaturbereich von 10°C unverändert, während die Vmax in diesem Bereich mit steigender Temperatur auf das Doppelte anwuchs.

3.8 Die Abhängigkeit des Phosphat- und 3-Phosphoglycerat-Transportes vom Medium-pH

In den folgenden Experimenten wurde bei 4°C und Dämmerlicht die Substrataufnahme konzentrationsabhängig bei verschiedenem Medium-pH bestimmt.

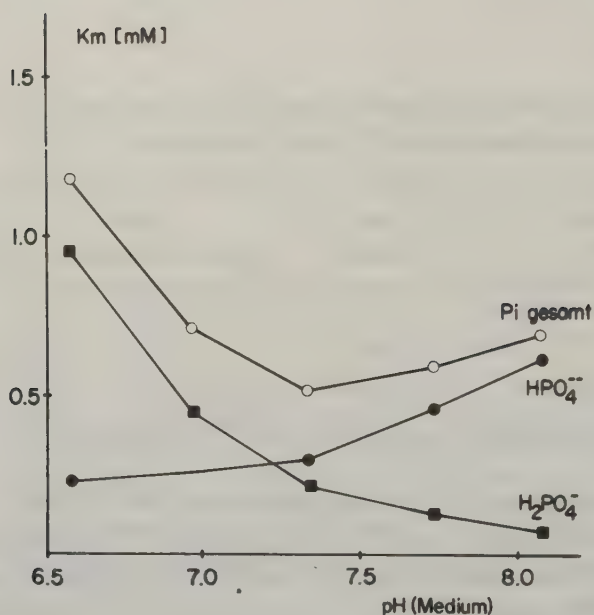


Abbildung 8 a

pH-Abhängigkeit der Michaelis-Konstante von anorg. Phosphat;
Temp. 4°C, 10 sec., Dunkelheit.

Wie Abbildung 8 a verdeutlicht, war die Michaelis-Konstante für Phosphat bei niedrigem Medium-pH am größten, fiel bei einem pH von 7,4 auf ein Minimum ab, und stieg dann mit dem pH leicht wieder an.

In dem gemessenen pH-Bereich liegt das Phosphat mit einem pK-Wert von 7,2 in der ein- und zweiwertigen Form vor. Betrachtet man in Abbildung 8 a den Verlauf der errechneten K_m -Kurve für die zweiwertige Form, so erkennt man, daß die Michaelis-Konstante bis zu einem pH-Wert von 7,4 fast konstant bleibt und erst bei einem höheren pH-Wert leicht ansteigt. Der plateauartige Verlauf der K_m -Kurve mag ein Hinweis dafür sein, daß im physiologischen pH-Bereich die zweiwertige Phosphatform vom Carrier akzeptiert wird.

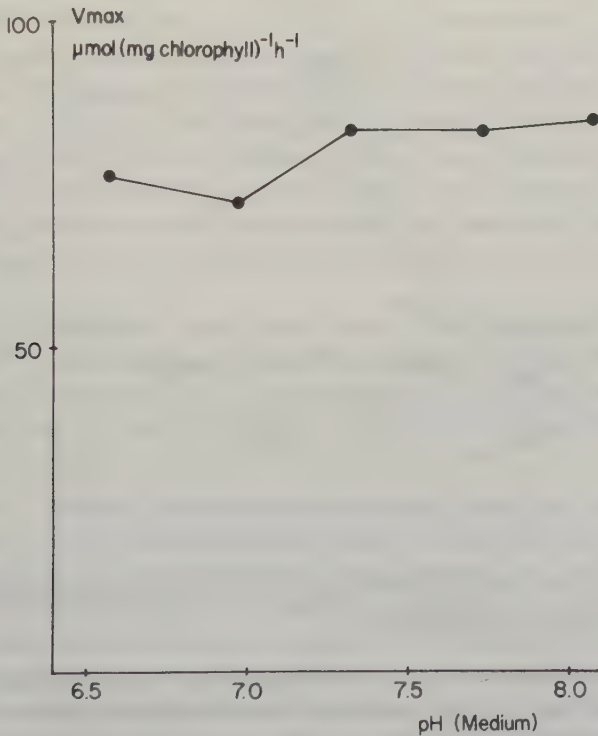


Abbildung 8 b

pH-Abhängigkeit der Maximalgeschwindigkeit von anorg. Phosphat;
Temp. 4°C, 10 sec., Dunkelheit.

Die Abbildung 8 b zeigt, daß sich die Maximalgeschwindigkeit für anorganisches Phosphat in dem gesamten gemessenen pH-Bereich nicht wesentlich änderte.

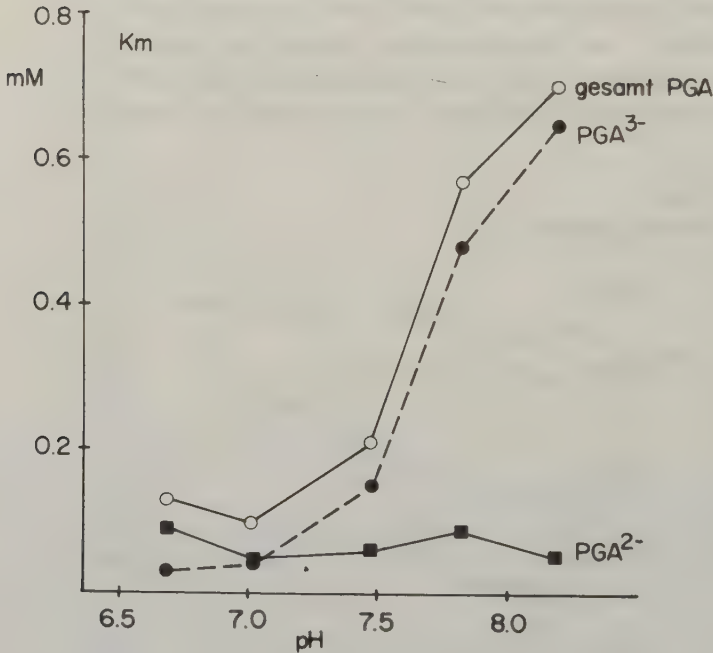


Abbildung 9

pH-Abhängigkeit der Michaelis-Konstante von 3-Phosphoglycerat;
Temp. 4°C, 10 sec., Dunkelheit.

Die Michaelis-Konstante für 3-Phosphoglycerat wies in dem Experiment der Abbildung 9 einen mit wachsenden pH ansteigenden Kurvenverlauf auf. In dem vorgegebenen pH-Bereich lag 3-Phosphoglycerat mit einem pK-Wert von 7,1 in der zwei-

und dreiwertig negativen Form vor. Abbildung 9 zeigt, daß die Michaelis-Konstante der zweiwertig negativen Form von einem sich ändernden Medium-pH unverändert bleibt. Dieses Verhalten spricht dafür, daß Phosphoglycerat ebenfalls als zweiwertiges Anion transportiert wird. Auch hier bleibt die Maximalgeschwindigkeit über den gesamten untersuchten pH-Bereich nahezu unverändert.

3.9 Abhängigkeit der 3-Phosphoglycerat- und Phosphataufnahme von der Beleuchtung und der Zugabe divalenter Kationen

In früheren Arbeiten haben Werdan und Heldt (1972) gezeigt, daß bei Belichtung der Chloroplasten eine Alkalisierung des Stromas und ein verstärkter Hineintransport von 3-Phosphoglycerat in den Sorbit-impermeablen Raum erfolgen. Sie vermuteten, daß der sich bei Belichtung durch Ansteigen des Stroma-pH's aufbauende pH-Gradient die treibende Kraft für den stimulierten 3-Phosphoglycerat-Hineintransport sei.

Kürzlich stellten Portis und Heldt (1976) außerdem fest, daß bei Belichtung nicht nur eine Alkalisierung des Stromas erfolgt, sondern auch durch Ausströmen von Mg-Ionen aus den Thylakoiden in das Stroma hinein dort die Konzentration auf 2 mM ansteigt.

Es baut sich also unter Lichteinwirkung nicht nur ein pH-, sondern auch ein Mg-Gradient über der inneren Hüllmembran auf, der unter Umständen ebenfalls Einfluß auf den Substrat-Transport haben könnte. Deshalb sollte in den folgenden Versuchen geklärt werden, ob der 3-Phosphoglycerat- und Phosphattransport durch den Carrier speziell durch Aufbau bzw. Abbau eines divalenten Kationengradienten über die innere Hüllmembran beeinflusst werden kann. Eine Beeinflussung des Phosphoglycerat-Transportes durch Mg-Ionen wurde kürzlich schon von Schäfer (1975) beobachtet.

Tabelle 5a

Abhängigkeit der Transportgeschwindigkeit von der Beleuchtung und Zugabe divalenter Kationen

Expt. Nr.	Transport von	Expt.-Bedingungen	Transportgeschwindigkeit /μMol/mg Chloro. · h	%	pH Stroma	
92	PGA	Licht	-	34,12	100	7,82
		+ MgCl ₂ (5 mM)	25,15	74	7,31	
		+ A ₂₃₁₈₇ (8 /μM)	24,22	71	7,42	
		+ MgCl ₂ + A ₂₃₁₈₇	25 25	74	7,39	
		+ CaCl ₂ (5 mM)	15,35	45	7,33	
		+ CaCl ₂ + A ₂₃₁₈₇	18,08	53	7,51	
		Dunkel	-	20,47	60	6,97
		+ MgCl ₂ (5 mM)	15,69	46	6,59	
		+ A ₂₃₁₈₇ (8 /μM)	16,72	49	6,84	
		+ MgCl ₂ + A ₂₃₁₈₇	22,17	65	7,45	
+ CaCl ₂ (5 mM)	12,96	38	6,85			
+ CaCl ₂ + A ₂₃₁₈₇	17,06	50	7,54			

Tabelle 5b

Abhängigkeit der Transportgeschwindigkeit von der Beleuchtung und Zugabe divalenter Kationen

Expt. Nr.	Transport von	Expt.-Bedingungen	Transportgeschwindigkeit $\mu\text{Mol/mg Chloro.} \cdot \text{h}$	%	pH Stroma
93	PGA	Licht			
		-	56,16	100	7,86
		+ MgCl_2 (5 mM)	43,24	77	7,19
		+ A_{23187} (8 μM)	34,81	62	6,31
		+ MgCl_2 + A_{23187}	38,18	68	7,15
		+ CaCl_2 (5 mM)	30,32	54	7,06
		+ CaCl_2 + A_{23187}	31,44	56	7,37
93	Pi	Licht			
		-	69,16	100	7,86
		+ MgCl_2 (5 mM)	83,33	120,5	7,19
		+ A_{23187} (μM)	61,34	88,7	6,31
		+ MgCl_2 + A_{23187}	75,59	109,3	7,15
		+ CaCl_2 (5 mM)	63,00	91,1	7,06
		+ CaCl_2 + A_{23187}	67,70	97,9	7,37

Tabellen 5a und 5b zeigen, wie sich unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen die Transportraten von 3-Phosphoglycerat und anorganischem Phosphat ändern.

Im Licht wird in bekannter Weise mehr 3-Phosphoglycerat in den Sorbit-impermeablen Raum transportiert, als im Dunkeln, wobei die Steigerungsrate in diesem Experiment 40 % beträgt. Ein Erniedrigen des während der Belichtung bestehenden Mg^{++} -Gradienten, erreicht durch Zugabe von $MgCl_2$ in das Medium, hat ein Absinken des 3-Phosphoglycerat-Transportes um 25 % und eine beträchtliche Verringerung des pH's im Stroma zur Folge.

Gleiche Wirkung hat Ionophor A 23187, der die Chloroplasten-Membran für Mg^{++} und für Ca^{++} durchlässig macht. Dadurch wird bei seiner Anwesenheit durch Ausströmen von Mg^{++} aus dem Stroma ebenfalls ein Zusammenbruch des Mg^{++} -Gradienten erreicht. Das Ergebnis entspricht deshalb dem oben Beschriebenen.

Auch eine Kombination von außen zugegebenem $MgCl_2$ und Ionophor brachte unter Lichteinwirkung im Hinblick auf pH-Stroma- und 3-Phosphoglycerat-Transportänderungen kein neues Ergebnis.

Neben der Wirkung des Mg^{++} auf den durch den Carrier katalysierten Substrat-Transport war auch die des Ca^{++} von Interesse. Es ist ein divalentes Kation, das nur bei Anwesenheit des Ionophors A 23187 die Chloroplasten-Membran passieren kann, und das, wenn es die Möglichkeit des Einstromes hat, nach Blockierung der Fructose-1.6-diphosphatase die CO_2 -Fixierung hemmt (Baier 1976).

Setzt man den Chloroplasten außen $CaCl_2$ in 5 mM Endkonzentration zu, dann sinken auch bei Belichtung die Phosphoglycerataufnahmeraten und das pH im Stroma ab, und zwar noch in stärkerem Maße als bei Mg^{++} -Zugabe.

Bei Experimenten, die unter identischen Bedingungen im Dunkeln durchgeführt wurden, ergab sich für den 3-Phosphoglycerat-Transport und für die pH-Stroma-Änderung ein gleiches Resultat.

Die Absolutwerte lagen dabei nur noch etwas niedriger als bei den Lichtexperimenten.

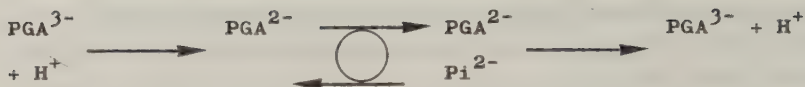
Ganz anders war die Situation beim Phosphat-Transport. Hier beobachtete man keinen deutlichen Kationeneinfluß auf die Phosphataufnahmerate.

Da beide Kationen eine Änderung des Stroma-pH's bewirken, ließe sich ihre Wirkung auf den Phosphoglycerat-Hineintransport allein über die pH-Änderung im Stroma erklären. Die Daten in den Tabellen 5a und 5b können daher nicht als Beweis für eine direkte Einwirkung von Ca^{++} und Mg^{++} auf den Phosphoglycerat-Transport angesehen werden.

Der impermeable Raum, der jeweils bei den verschiedenen experimentellen Bedingungen bestimmt wurde, zeigte bei Kationenzugabe große Schwankungen. Sein Volumen nahm im Verhältnis zum $^3\text{H}_2\text{O}$ -Raum um 2 - 4 %, absolut betrachtet um 7 - 10 % ab.

3.10 Abhängigkeit des Phosphat- und 3-Phosphoglycerat-transportes vom pH-Gradienten über die innere Chloroplastenmembran

Die Ergebnisse aus den Versuchen 3.8 ergaben den Hinweis, daß sowohl anorganisches Phosphat als auch 3-Phosphoglycerat in zweifach negativ geladener Form transportiert werden. Da jedoch Phosphoglycerat ($\text{pK } 7,1$) bei einem als physiologisch angesehenen Medium-pH von 7,6 vorwiegend als dreiwertiges Anion vorliegt, bedingt der Transport des zweiwertigen Anions einen indirekten Protonen-Transport über die Hüllmembran.



Dieser elektronenneutrale Transport von 3-Phosphoglycerat sollte durch einen über die Membran bestehenden Protonengradienten beeinflusst werden.

In den folgenden Versuchen soll dies experimentell bestätigt werden. Dazu mußte einerseits eine gewünschte pH-Änderung im Stroma möglich sein, andererseits ein Substratspiegel bekannter Verbindungen im Chloroplasten geschaffen werden können. Letzteres erreichte man durch Beladen der Chloroplasten mit anorganischem Phosphat. Durch diese Präinkubation wurde gewährleistet, daß es während des Hineintransportes der dem Carrier angebotenen Substrate nur zu einem im Gegentausch erfolgenden Hinaustransport von Phosphat kam. Der pH-Gradient zwischen Stroma und Außenraum konnte durch Belichten der Chloroplasten geändert werden. Zuvor war von Heldt et al. (1973) gezeigt worden, daß bei einem Licht-Dunkelwechsel charakteristische pH-Änderungen im Stroma auftreten. Gewöhnlich ist dabei das pH im Stroma wesentlich niedriger als im Chloroplasten umgebenden Medium.

Auch im Experiment der Tabelle 6 liegt der Wert der Stroma-pH's mit 7,0 deutlich unter dem des Medium-pH's mit 7.6. Der im Dunkeln bestehende pH-Gradient dürfte dabei Ausdruck eines Donnan-Potentials sein, das in ähnlicher Höhe auch von Gimmler et al. (1975) beobachtet wurde.

Werden die Chloroplasten belichtet, so kommt es durch Einstrom von Protonen in die Thylakoide aus dem Stroma dort zu einer Alkalisierung. Bei Zugabe von Entkopplern, z.B. m-Chlorcarbonylcyanidphenylhydrazon, erhält man bei belichteten Chloroplasten einen ähnlich niedrigen Stroma-pH-Wert

wie im Dunkeln (Heldt et al. 1973), weil die Nettoaufnahme von Protonen aus dem Stroma in den Thylakoidraum durch einen erhöhten passiven Rückstrom vermindert wird.

Berücksichtigt man nun das im Dunkeln beobachtete Donnan-Potential, so ist der im Licht vorhandene effektive Protonengradient über die innere Membran beträchtlich (Tabelle 6: Δ pH: 1,1).

Bei der experimentellen Durchführung wurde so vorgegangen, daß nach Isolierung der Chloroplasten diese bei 0°C und völliger Dunkelheit 15 Minuten lang mit kaltem anorganischen Phosphat (Endkonzentration: 5 - 10 mM) inkubiert wurden. Dann erfolgte nach mehrmaligem Waschen der Chloroplasten Zugabe von (^{14}C)-3-Phosphoglycerat (0,18 mM Endkonzentration) und (^{32}P)-anorganischem Phosphat (0,18 mM Endkonzentration), und Messung der Substrataufnahme in den Sorbit-impermeablen Raum. Die Temperatur während des Experimentes betrug 4°C, die Meßzeit 10 Sekunden. Im Lichtexperiment wurden die Proben bis zur eigentlichen Substrataufnahme 2 - 3 Minuten vorbelichtet, während die übrigen im Dunkeln aufbewahrt wurden, bis Licht- und Dunkelexperiment gleichzeitig durchgeführt werden konnten.

Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse jener Experimente.

Tabelle 6

Transport von Phosphat und 3-Phosphoglycerat in den Sorbit-impermeablen Raum in Abhängigkeit von der Substrat-Vorbeladung und der Belichtung. Medium-pH 7,6. Einzelheiten s. Methodik.

Vorbeladung	Bedingung	Zugabe (je 0,18 mM)	Aufnahme (nMol/mg Chlor. · 20 sec.)			pH in Stroma
			Pi	PGA	PGA/Pi	
Pi	Licht	Pi	106	--		
		PGA	--	151		
		Pi+PGA	59	133	2,25	8,1
	Dunkel	Pi	115	--		
		PGA	--	96		
		Pi+PGA	86	58	0,67	7,0

Aus den Ergebnissen der Tabelle 6 wird ersichtlich, daß es bei Belichtung der Chloroplasten zu einer deutlichen Steigerung des Phosphoglycerat-Transportes kommt, während der Transport von anorganischem Phosphat eher gehemmt zu sein scheint. Dieser Effekt wird besonders deutlich, wenn beide Substrate bei gleichzeitiger Zugabe von außen um den Hineintransport konkurrieren. Dann steigt der Quotient des hineintransportierten PGA/Pi von 0,67 im Dunkeln auf 2,25 im Licht an. Diese Bevorzugung des 3-Phosphoglycerates läßt sich damit erklären, daß der Protonengradient über die innere Hüllmembran die mit einem indirekten Protonentransport verbundene Phosphoglycerataufnahme treibt.

Der lichtabhängigen Steigerung des Phosphoglycerat-Hineintransportes entspricht eine lichtabhängige Hemmung des Phosphoglycerat-Austransportes, wie uns Abbildung 10 a zeigt.

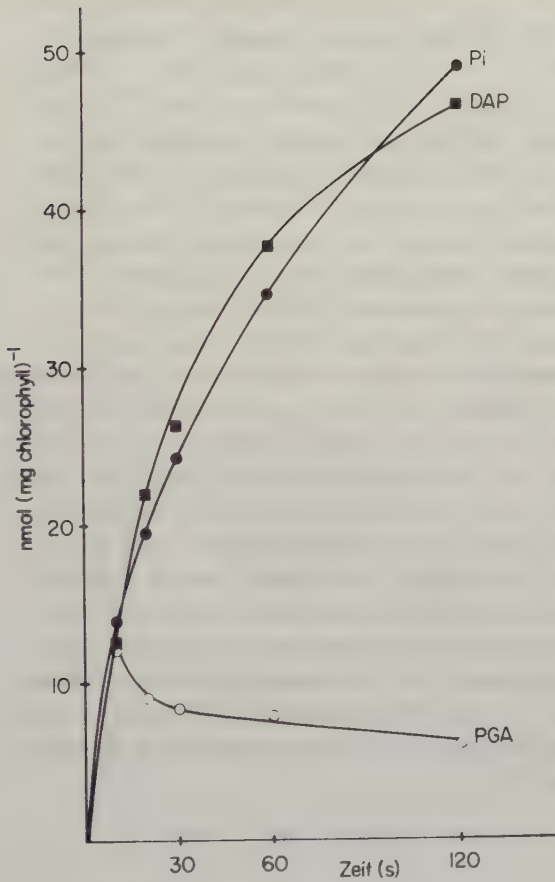


Abbildung 10 a

Austransport von Phosphat, Dihydroxyacetonphosphat und Phosphoglycerat aus dem Stroma in das Medium bei Belichtung der Chloroplasten. Einzelheiten s. Methodik und im Text.

In diesem Experiment wurden die Chloroplasten nach ihrer Isolierung mit (^{32}P)-anorganischem Phosphat beladen und 15 Minuten lang bei 16°C im Wasserbad belichtet. Um eine ausreichende CO_2 -Fixierung und Überführung von (^{32}P)-anorganischem Phosphat in phosphorylierte Intermediate zu erreichen, wurde die Chloroplastensuspension zusätzlich mit NaHCO_3 (3 mM Endkonzentration) versetzt. Nach mehrmaligem Waschen wurde dann der im Gegentauch gegen kaltes anorganisches Phosphat erfolgende Hinaustransport (^{32}P)-markierter Intermediate gemessen. Dabei konnte die im Medium erscheinende (^{32}P)-Radioaktivität analytisch in das mit Ammonium-Molybdat in einem organischen Extraktionsmittel (Isobutanol-Benzol) lösliche anorganische und in das nicht extrahierbare organische Phosphat unterteilt werden. Außerdem wurde bei dem organischen Phosphat zwischen einer Alkali-labilen und einer Alkali-beständigen Fraktion unterschieden. Alkali-labil sind Triosephosphate, die durch Hydrolyse Phosphat abspalten. Weiterhin schien die Beschreibung des Alkali-stabilen Phosphates als 3-Phosphoglycerat für eine weitere Differenzierung erlaubt, weil in intakten Chloroplasten nur Triosephosphate und 3-Phosphoglycerat schnell hinaustransportiert werden (Lilley et al. 1977), die übrigen Zuckerphosphate jedoch im Chloroplasten verbleiben.

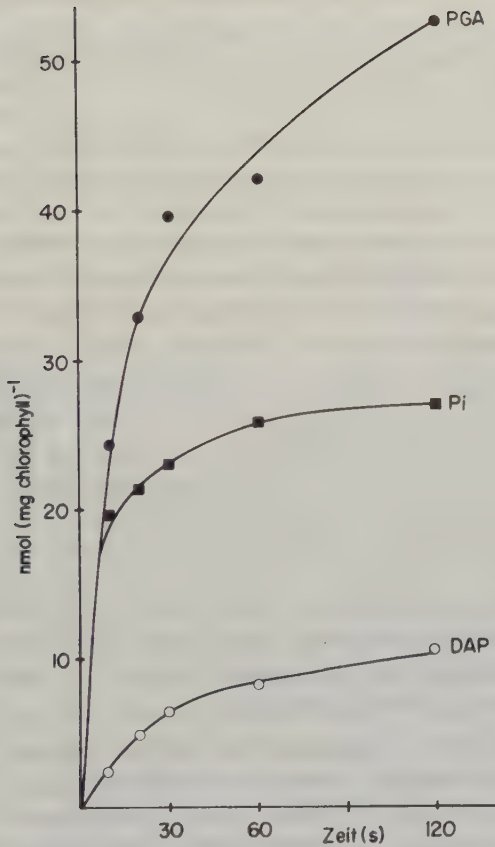


Abbildung 10 b

Austransport von Phosphat, Dihydroxyacetonphosphat und Phosphoglycerat aus dem Stroma in das Medium im Dunkeln. Einzelheiten s. Methodik und im Text.

Abbildung 10 a zeigt uns, daß bei Belichtung der Chloroplasten hauptsächlich anorganisches Phosphat und Triosephosphate ausgeschleust werden, wogegen 3-Phosphoglycerat nur in geringem Umfang transportiert wird.

Wenn man berücksichtigt, daß bei den oben beschriebenen Inkubationsbedingungen in den Chloroplasten weit mehr 3-Phosphoglycerat als Triosephosphat vorliegt, und letzteres trotzdem in wesentlich stärkerem Maße hinaus transportiert wird, dann muß der 3-Phosphoglycerat-Hinaustransport gegenüber der Ausschleusung von Triosephosphaten und anorganischem Phosphat stark gehemmt erscheinen.

Erfolgt der Hinaustransport dagegen im Dunkeln bei gleichen vorausgegangenen Inkubationsbedingungen, so ist die Hemmung des 3-Phosphoglycerat-Transportes aufgehoben, während der Triosephosphat-Hinaustransport durch das starke Absinken des Substratspiegels im Stroma nach Beendigung der Chloroplastenbelichtung deutlich vermindert ist.

Vergleicht man weiterhin die Transportraten von 3-Phosphoglycerat und anorganischem Phosphat, dann fällt auf, daß 3-Phosphoglycerat unter diesen Bedingungen schneller transportiert wird als anorganisches Phosphat.

Zusammenfassend können die Ergebnisse der letzten beiden Abbildungen so gedeutet werden, daß die lichtabhängige Hemmung des 3-Phosphoglycerat-Hinaustransportes ebenso durch den Protonengradienten zwischen Stroma- und Außenraum bedingt ist, wie die im Licht erfolgende Stimulierung des 3-Phosphoglycerat-Hineintransportes.

4. SCHLUSSFOLGERUNG

Der Phosphat-Carrier zeigt eine strenge Substratspezifität im Transport von anorganischem Phosphat, Triosephosphaten und 3-Phosphoglycerat. Er arbeitet im strikten Gegentauch und gewährleistet damit, daß die Gesamtmenge an Phosphat und phosphorylierten Intermediaten im Stroma gleich bleibt.

Es ist seine Aufgabe, die Endprodukte der CO_2 -Fixierung, die Triosephosphate und das 3-Phosphoglycerat, aus dem Stroma in das Cytosol zu transportieren. Die vorherigen Experimente haben gezeigt, daß es während der Belichtung der Chloroplasten in erster Linie die Triosephosphate sind, die durch den Carrier in das Cytosol der Pflanzenzelle ausgeschleust werden, obwohl während der CO_2 -Fixierung aufgrund der Reaktionsgleichgewichte bei den durch Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase und Phosphoglycerat-Kinase katalysierten Reaktionen zehnmal mehr 3-Phosphoglycerat als Triosephosphat im Stroma vorliegt (Portis et al. 1977). Ursache des gegenüber dem 3-Phosphoglycerat-Hinaustransport bevorzugten Exportes der Triosephosphate dürfte die lichtabhängige Hemmung der 3-Phosphoglycerat-Ausschleusung durch den Protonengradienten sein. Nach dem Transport in das Cytosol dient dann Dihydroxyacetonphosphat dort als Ausgangsprodukt der Saccharose-Synthese, die mit diesem Substrat die geeignete Transportform für die Ableitung des fixierten Kohlenstoffs schafft.

Der Phosphat-Carrier versorgt die Zelle aber nicht nur mit den aus dem Stroma-Raum stammenden Kohlehydraten, sondern auch mit reduzierenden und phosphorylierenden Äquivalenten.

Es war vor einigen Jahren schon gezeigt worden (Heldt und Sauer 1971), daß die Innenmembran für Pyridin- und Adennin-

nukleotide impermeabel ist. Zwar gibt es einen spezifischen ATP-Carrier, doch scheint die direkte Ausschleusung von ATP aus dem Stroma in das Cytosol dennoch nicht voll gewährleistet zu sein, weil dieser Translokator das ATP in erster Linie aus dem Cytosol in das Stroma (Helldt 1969) transportiert, es aber dagegen nur sehr langsam aus den Chloroplasten in die Zelle ausschleust. Durch den PGA-Hinein- und DPA-Hinaustransport wird aber über den Carrier eine Möglichkeit geschaffen, das Cytosol ausreichend mit reduzierenden und phosphorylierenden Äquivalenten zu versorgen (Heber 1974). Denn das aus dem Stroma in das Cytoplasma transportierte Dihydroxyacetonphosphat kann dort unter Gewinnung von NADPH und ATP zu 3-Phosphoglycerat oxidiert werden, das gebildete 3-Phosphoglycerat seinerseits nach Hineintransport in die Chloroplasten dort wieder für die Bildung von Dihydroxyacetonphosphat zur Verfügung stehen.

Der Phosphat-Carrier wirkt also auch über die lichtabhängige Stimulierung des 3-Phosphoglycerat-Hineintransportes und durch die im Licht bevorzugte Ausschleusung von Dihydroxyacetonphosphat als indirekter Transportmechanismus für die bei der Photophosphorylierung entstandene Energie.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Im methodischen Teil werden die verwendeten Materialien, Versuchsanordnungen und Berechnungen der verschiedenen experimentellen Ergebnisse dargestellt. Der experimentelle Teil dieser Arbeit hat die genauere Charakterisierung des von Heldt und Rapley (1970) beschriebenen Phosphat-Carriers zum Inhalt. Er zeigt die für einen Carrier charakteristischen Eigenschaften: Sättigungsverhalten, kompetitive Hemmung und eine ausgeprägte Substratspezifität. Dabei besitzt der Carrier für anorganisches Phosphat und C-3 Kohlenstoffketten mit einem endständig veresterten Phosphatrest die größte Affinität, während er Verbindungen mit zunehmender Kettenlänge und mit einem nicht endständig lokalisierten Phosphatrest deutlich schlechter akzeptiert. Einmal gebunden, werden alle Phosphatverbindungen recht ähnlich transportiert. Der Phosphattransport selbst ist stark temperaturabhängig. Die Aktivierungsenergie des Carriers beträgt in dem Temperaturbereich von 0°C - 12°C 16 Kcal/Mol, woraus sich für die Geschwindigkeit des Phosphattransportes bei 20°C ein fünfmal höherer Wert als bei 4°C extrapolieren läßt. Die Michaelis-Konstante des 3-Phosphoglycerat-Transportes bleibt zwischen 0°C und 10°C unverändert, während die V_{max} bei Zunahme der Temperatur von 0°C auf 10°C auf das Doppelte anwächst.

Die von dem Carrier akzeptierte Ionenform ist wahrscheinlich die zweifach negativ geladene Form. Für das bei einem als physiologisch angesehenen Medium-pH von 7,6 als dreiwertiges Anion vorliegende Phosphoglycerat bedeutet dies, daß es beim Transport als zweiwertiges Anion einen indirekten Protonentransport über die innere Membran bedingt. Sein elektronenneutraler Transport ist deshalb von einem über die Membran bestehenden Protonengradienten abhängig. Die bei Belichtung der Chloroplasten entstehende pH-Stroma-Veränderung

bewirkt darum eine Hemmung des PGA-Hinaus- bzw. eine Stimulierung des PGA-Hineintransportes. Ebenfalls über eine pH-Stroma-Änderung dürfte der divalente Kationeneinfluß auf den 3-Phosphoglycerat-Transport zu erklären sein, der Phosphattransport bleibt dagegen unbeeinflußt.

Alle Transportvorgänge erfolgen bei dem beschriebenen Phosphat-Carrier im strikten Gegentauch. Die Stöchiometrie beträgt 1:1.

Es ist seine Aufgabe, die bei der CO_2 -Fixierung entstehenden Produkte aus dem Stroma in das Cytosol hinauszutransportieren und es indirekt über einen Phosphoglycerat-Hineintransport und Dihydroxyacetonphosphat-Hinaustransport während Licht-einwirkung mit reduzierenden und phosphorylierenden Äquivalenten zu versorgen.

6. ABKÜRZUNGEN

ATP	Adenosintriphosphat
Chloro.	Chlorophyll
DAP	Dihydroxyacetonphosphat
D-GAP	D-Glycerinaldehydphosphat
Ki	Dissoziationskonstante der Enzym-Inhibitor- Verbindung
Km	Michaelis-Konstante
NADH	Nicotinadenindinucleotid
NADPH	Nicotinadeninnucleotidphosphat
3-PGA	3-Phosphoglycerinsäure
Pi	anorganisches Phosphat
U	Enzymeinheit
Vmax	Maximalgeschwindigkeit

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Baier, D. (1976)
Dissertation, Fakultät für Landwirtschaft und Gartenbau
Weihenstephan der Technischen Universität München
- Bergmeyer, H.U. (1974)
Methoden der enzymatischen Analyse, 3. Auflage
Verlag Chemie, Weinheim
- Cockburn, W., Walker, D.A. und Baldry, C.W. (1968)
Biochem. J. 107, 89-95
- Gimmler, H., Schäfer, G. und Heber, U. (1975)
Proceedings of the Third International Congress on
Photosynthesis
(M. Avron ed.) p.p. 1381-1392
Elsevier, Amsterdam
- Heber, U. (1974)
Ann. Rev., Plant Physiol. 25, 393-421
- Heldt, H.W. (1969)
FEBS Letters 5, 11-14
- Heldt, H.W. und Rapley, L. (1970)
FEBS Letters 10, 143-148
- Heldt, H.W. und Sauer, F. (1971)
Biochim. Biophys. Acta 234, 83-91
- Heldt, H.W., Werdan, K., Milovancev, M. und Geller, G.
(1973)
Biochim. Biophys. Acta 314, 224-241
- Klingenberg, M., Pfaff, E. (1967)
Methods Enzymol., 10 (680)
- Leech, R.M. (1966)
in Godwin, T.W., Biochemistry of Chloroplasts Vol. 1,
London, New York, 65
- Lehner, K. und Heldt, H.W. (1977)
Biochim. Biophys. Acta
zur Veröffentlichung eingereicht
- Lilley, R., Chon, C.I., Mosbach, A. und Heldt, H.W. (1977)
Biochim. Biophys. Acta in Druck
- Nielsen, S.O. und Lehninger, A.L. (1955)
J. Biol. Chem. 215, 555-570

Portis jr., A.R. und Heldt, H.W. (1976)
Biochim. Biophys. Acta 448, 133-142

Portis jr., A.R., Chon, C.I., Mosbach, A. und Heldt, H.W.
(1977)
Biochim. Biophys. Acta in Druck

Schäfer, G. (1975)
Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät
der Universität Düsseldorf

Schäfer, G., Heber, U. und Heldt, H.W. (1977)
Plant. Physiol. in Druck

Walker, D.A. (1976)
in The Intact Chloroplast (J. Barber, ed.)
p.p. 235-274, Elsevier, Amsterdam

Werdan, K. und Heldt, H.W. (1972)
Proceedings of the Second International Congress on
Photosynthesis (G. Forti, M. Avron und A. Melandri, ed.)
Vol. 2, p.p. 1337-1344
Dr. W. Junk N.V. Publishers, The Hague

Whatley, F.R., Arnon, D.J. (1963)
Methods Enzym. 6 (308)

LEBENS LAUF

Am 6.1.1949 wurde ich, Rainer Fliege, als Sohn des Arztes Dr. Hans Joachim Fliege und seiner Ehefrau Gisela, geb. Reinshagen, in Halle an der Saale geboren. Die Volksschule besuchte ich in Berlin-Pankow und in München. Hier trat ich 1960 in die humanistische Abteilung des Wittelsbacher Gymnasiums ein und legte dort 1969 das Abitur ab. Im Herbst des gleichen Jahres begann ich das Studium der Medizin an der Universität München, wo ich 1970 die naturwissenschaftliche, 1972 die ärztliche Vorprüfung und 1975 die ärztliche Prüfung bestand.

In der Zeit vom Januar 1973 bis zum September 1974 war ich als Doktorand am Institut für Physikalische Biochemie der Universität München (Prof. Dr. M. Klingenberg) tätig.

Dort arbeitete ich auch 5 Monate als Medizinalassistent, die übrige Zeit in der Chirurgischen Universitätsklinik (Prof. Dr. G. Heberer) und in der II. Medizinischen Klinik in Grosshadern (Prof. Dr. Karl).

Am 6.6.1977 werde ich im Rahmen meines Wehrdienstes meine ärztliche Tätigkeit bei der Bundeswehr aufnehmen.

